

therezinha prado de a. gomes

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA GLUCOSE-6-FOSFATO
DESIDROGENASE DE POLYPORUS CIRCINATUS Fr**

Tese apresentada ao Instituto de Bioquímica da
Universidade Federal do Paraná para obtenção
do título de Mestre em Bioquímica.

Orientadora: Dra. Glaci T. Zancan

Curitiba - Paraná

1972

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA GLUCOSE-6-FOSFATO
DESIDROGENASE DE POLYPORUS CIRCINATUS Fr**

Tese apresentada ao Instituto de Bioquímica da
Universidade Federal do Paraná para obtenção
do título de Mestre em Bioquímica.

Curitiba - Paraná
1972

Í N D I C E

	<u>Pág.</u>
ÍNDICE	1
1. INTRODUÇÃO	3
2. MATERIAIS E MÉTODOS	11
2.1 MATERIAIS	11
2.2 CULTURA DE CÉLULAS	11
2.3 EXTRATO LIVRE DE CÉLULAS	12
2.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	12
2.5 TÉCNICAS ANALÍTICAS	13
2.6 PREPARAÇÃO DA ENZIMA	13
2.7 CINÉTICA DA G-6-P DESIDROGENASE	15
3. RESULTADOS	18
TABELA I - PURIFICAÇÃO DA ENZIMA	22
FIGURA 1 - CROMATOGRAFIA	23
FIGURA 2 - EFEITO DA TEMPERATURA	24
FIGURA 3 - EFEITO DO pH	25
TABELA II - ATIVAÇÃO POR ÍONS	26
TABELA III - EFEITO DE INIBIDORES DE GRUPAMENTOS SH ⁻	26
FIGURA 4 - CONSTANTE DE MICHAELIS MENTEN PARA G-6-P	27
FIGURA 5 - CONSTANTE DE MICHAELIS MENTEN PARA NADP	27
FIGURA 6 - GRÁFICOS DOS INVERSOS DE VELOCIDADE DE REAÇÃO EM FUNÇÃO DA VARIAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE G-6-P	28
FIGURA 7 - GRÁFICO DOS INVERSOS DA VELOCIDADE DE REAÇÃO EM FUNÇÃO DA VARIAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE NADP	28
FIGURA 8 - GRÁFICO DE HILL DA SATURAÇÃO DA G-6-PD COM G-6-P	29

TABELA IV - VALORES DAS CONSTANTES DA EQUAÇÃO DE HILL E VALORES DE n NA AUSÊNCIA DE METABÓLITOS	30
TABELA V - EFEITO DE METABÓLITOS SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA	31
FIGURA 9 - EFEITO DE ATP SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM pH 8,0 E ALTAS CONCENTRAÇÕES DE ATP	32
TABELA VI - EFEITO DE ATP SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM DIFERENTES pH	33
FIGURA 10A E 10B - GRÁFICO DE HILL DO EFEITO DE ATP SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA	34
FIGURA 11A- EFEITO DE NADH SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA	35
FIGURA 11B- GRÁFICO DE HILL DO EFEITO DE NADH SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA	35
FIGURA 12A- EFEITO DE NADPH SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA	36
FIGURA 12B- GRÁFICO DE HILL DO EFEITO DE NADPH SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA	36
4. DISCUSSÃO	37
5. CONCLUSÕES	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A desidrogenase da glucose-6-fosfato* (D-glucose-6-fosfato: NADP oxido-redutase EC 1.1.1,49) é a enzima que catalisa a reação de óxido-redução que inicia a via metabólica das pentoses-fosfato.

Desde sua descoberta por Warburg em 1931, um grande número de trabalhos sobre estudos enzimológicos de G-6-PD, têm sido publicados (1).

Recentemente porém, a importância fisiológica desta enzima tem sido enfatizada por ser a primeira enzima da via das pentoses-fosfato, catalisando uma reação que "in vivo" é essencialmente irreversível e está idealmente situada no ponto de ramificação das duas vias de oxidação de carboidratos.

Segundo Horecker (2) dentre as principais funções do ciclo das pentoses-fosfato, estão as seguintes:

- a) Produção do potencial de redução (NADPH) necessário à biossíntese tanto do glicogênio como dos lipídeos e esteróides.
- b) Formação das pentoses necessárias à síntese dos nucleotídeos.
- c) Formação de precursores, para a origem dos ácidos aminados aromáticos.
- d) Formação do acceptor primário do CO_2 no curso da fotossíntese.

(*) Será usada abreviadamente G-6-PD

Destas a mais importante seria a regeneração do NADPH na fração citoplasmática das células (3), já que há evidências de que a maioria das pentoses utilizadas para biossíntese originam-se através da via não oxidativa, na qual um fragmento de dois carbonos une-se ao gliceraldeído-3-fosfato originado pela quebra da frutose 1,6-difosfato, catalisada pela aldolase (4). Além disso há evidências de que tratamentos que levam à oxidação de NADPH causam imediato estímulo desta via em levedura (5,6). Por sua localização e também por ser uma das poucas enzimas que catalisam a formação de NADPH a partir de NADP, sua regulação é de considerável importância, estando sujeita à ação de vários ativadores e inibidores além de vários fatores os quais têm sido demonstrados afetar o equilíbrio entre formas ativas e sub-ativas especialmente no caso de eritrócitos humanos (7).

A contribuição relativa das vias oxidativa e não oxidativa para o "pool" das pentoses-fosfato varia de acordo com o estágio de crescimento das células, a natureza da fonte de carbono fornecida ao meio e mesmo devido à infecção por bacteriófagos. A atividade de uma enzima-chave, entretanto, como é o caso da G-6-PD não varia de modo significativo com várias condições de crescimento, pelo menos em E.coli, e portanto sua atividade deve ser modulada por alguns efetores na célula (8).

Em levedura, por exemplo, que oxida carboidratos através das vias glicolítica e das pentoses-fosfato, a distribuição da glucose para as duas vias pode ser controlada pela disponibilidade de cofatores como NADP e ADP, e por analogia com outras vias metabólicas pode-se esperar que este controle fino seja suplementado por um controle grosseiro exercido pela variação nas quantidades de enzima (5,9).

Um grande número de compostos têm sido relatados como inibidores de G-6-PD em muitos organismos dife-rentes.

Em levedura, Glaser & Brown (10) confirmaram a inibição por ortofosfato e sua reversão por excesso de NADP que já havia sido demonstrada por Theorell em 1935, assim como a inibição por NADPH observada por Negelein & Haas ainda em 1935. Êstes autores verificaram também a inibição da G-6-PD por glucosamina-6-P.

Eger-Neufeldt et alli (11) demonstraram ser a G-6-PD isolada de levedura altamente sensível ao efeito inibitório de acyl-CoA de cadeias longas, diminuindo a sensibilidade proporcionalmente ao encurtamento da cadeia. Êstes resultados foram mais tarde confirmados por Taketa e Pogell (12) em G-6-PD de levedura e de fígado de rato, utilizando Palmitil-CoA que dependendo da concentração inativa totalmente a enzima.

Lowry e Passonneau (13) confirmaram o efeito de Pi e NADPH em G-6-PD de levedura, relatando ainda a inibição da enzima por sulfato e ATP com particular referência a um possível contrôle metabólico.

Ainda em 1966 Avigad (14) empregando a G-6-PDH de levedo numa reação acoplada para análise de um sistema de hexoquinase bacteriana, verificou o efeito inibitório do ATP sôbre a velocidade de oxidação. Esta inibição entretanto dependia do pH do meio de reação, da concentração do substrato, da presença de cátions ativadores, etc. O autor concluiu que o ATP assim como outros nucleosídeos trifosfatos são fatôres determinantes da taxa de oxidação catalizada pela G-6-PD e não apenas a disponibilidade de G-6-P ou a concentração relativa NADP: NADPH, na célula.

Nos seus estudos entretanto Avigad só encontrou inibição em pH abaixo do ótimo para a enzima, em concentrações sub-saturantes de G-6-P e na ausência de ions Mg^{++} .

Também em 1966 A. Bonsignore et alii (15) apresentaram um estudo detalhado sobre inibição de G-6-PD de levedura por ATP e outros nucleosídeos fosfato. Este estudo, citado por Greenhouse, Nowaki & Coe, (24) desenvolve uma cinética de reação que evidencia o tipo de ligação entre ATP e a enzima.

Mais tarde Lee & Kosicki (16) confirmaram o efeito inibidor de ATP, GTP, ITP e dinucleotídeos correspondentes, além de palmitil CoA, CoA e PPi sobre a G-6-PD de levedura, e a redução deste efeito na presença de ions Mg^{++} . A G-6-PD de fígado de rato também mostrou-se sensível ao ATP, GTP e ITP que facilitaram o efeito inibidor de ácidos graxos livres em pH diferente do ótimo para a enzima (17). Já a G-6-PD de embrião de peixe (18) foi comprovada ser sensível ao ATP quando as concentrações de substrato estavam abaixo do nível saturante e o pH abaixo do ótimo.

Em Pseudomonas aeruginosa (19) Lessie & Neidhart investigaram a possibilidade de ser o controle da atividade da G-6-PD que governa a operação da via Entner-Doudoroff. Encontraram que o ATP inibe a G-6-PD dependendo da concentração do substrato; seu efeito parece ser o de diminuir a afinidade da enzima pelo substrato quando este está em concentrações baixas, sem entretanto afetar de modo significativo a atividade da enzima quando esta está saturada pelo substrato. Dos nucleotídeos estudados apenas o AMP e CTP não tiveram efeito inibidor, enquanto que os demais: ATP, ADP, GTP, GDP, GMP e UTP inibiram a reação.

L.Luzzatto (20) trabalhando com G-6-PD de eritrócitos humanos (tipo eletroforético A) chegou a uma curva sigmoideal de saturação da enzima em relação ao NADP, mostrando que a afinidade da G-6-PD pela coenzima varia com a concentração desta. Foram calculadas duas constantes de dissociação: K_{s1} e K_{s2} correspondentes a dois estados diferentes de afinidade da enzima pela coenzima.

O autor, analisando os dados obtidos pelo método gráfico de Hill, concluiu haver uma interação positiva enzima-coenzima ($n > 1$), a qual decresce ($n < 1$) quando NADPH é colocado no meio de reação.

Um grande número de investigações têm sido realizadas com G-6-PD de eritrócitos humanos pois esta apresenta uma variedade de tipos geneticamente determinados e de interesse médico. Apesar disso L.Luzzatto parece ter sido o primeiro autor a encontrar uma cinética diferente da cinética clássica, estudada por outros autores no mesmo material, como é o caso, por exemplo, de Soldin & Balinsky (21). Estes autores utilizando sangue tipo Bantu purificaram ao alto grau a G-6-PD dos eritrócitos a qual teve um comportamento cinético dentro dos moldes clássicos de Michaelis-Menten tanto em relação ao substrato (G-6-P) como em relação à coenzima. Outros como Chung & Langdon (22) e principalmente Yoshida (23), fizeram extensos estudos sobre estrutura da G-6-PD de eritrócitos humanos chegando a comprovar a hipótese de ser a enzima uma proteína oligomérica, sujeita a alterações por diluição e que requer NADP ligado para ter atividade catalítica, não estudando entretanto a influência destes fatos sobre a cinética de reação nem sobre a regulação da enzima.

Outro material humano estudado foram células de carcinoma de Ehrlich, por Greenhouse et alii (24), cuja G-6-PD mostrou um comportamento cinético diferente

do clássico esperado. Evidenciou-se no gráfico dos inversos da velocidade de reação contra inversos da concentração de substrato que uma relação linear apenas apareceu quando a enzima era ensaiada na presença de ATP 4mM, enquanto que na ausência de ATP ou na sua presença em concentrações 2mM curvas parabólicas foram obtidas.

Shindler & Schlegel (25) estudaram a regulação da G-6-PD por ATP em diferentes espécies bacterianas tendo encontrado efeito inibidor de ATP sôbre as enzimas de Hydrogenomonas facilis e Pseudomonas fluorescens, caracterizado por curvas sigmoidais de saturação pelo substrato. As demais bactérias estudadas (Acetomonas suboxydans, Acetobacter xylinum e E.Coli) não tiveram suas enzimas inibidas por ATP e apresentarem curvas hiperbólicas de saturação por substrato, obedecendo à cinética de Michaelis Menten. Os autores apresentam um desenvolvimento cinético detalhado sôbre inibição mostrando ser o ATP um efetor alostérico negativo da enzima e afirmando que a G-6-PD participa de uma via metabólica que distingue diferentes microorganismos pelo seu significado no metabolismo geral. Assim para as bactérias que degradam hexoses pela via Entner-Dou doroff é provavelmente a 1ª. enzima específica a ter simplesmente uma função catabólica.

Recentemente Horne, Anderson & Nordlie (26) investigando os efeitos inibidores de Adenosina 5' trifosfa tos e outros nucleosídeos 5' trifosfatos e difosfatos sôbre a G-6-PD de levedura encontraram respostas em concordância com aquelas de Avigad, isto é, os resultados de inibição por ATP, considerados com respeito a vários substratos, seguiram os padrões cinéticos clássicos. Segundo os autores, provavelmente os nucleotídeos devam constituir uma forma para limitar a remoção da G-6-P através de oxidação direta, possibi litando a manutenção deste substrato para a síntese de glicogênio na célula.

Em E.coli, Sanwall (8) observou que o NADPH inibe competitivamente a G-6-PD quando a concentração NADP é a variável, sendo que na presença de NADPH os gráficos de velocidade inicial de reação contra concentrações diferentes de NADP resultaram em curvas sigmoidais indicando ser este um efector alostérico negativo com relação ao NADP mas não com relação a G-6-P.

Outro microorganismo cuja G-6-PD tem sido bastante estudada é o Leuconostoc mesenteroides, para a qual Olive & Levy (27) recentemente encontraram uma cinética de inibição por NADPH dentro dos padrões convencionais de Michaelis Menten, tendo proposto um modelo de mecanismo de reação para ambas enzimas: NAD e NADP dependentes.

Interessantes resultados foram relatados por Muto e Uritani (28) sobre a G-6-PD de células de raiz de batata doce. Uma cinética usual foi demonstrada nos gráficos de velocidade inicial de reação contra variação de concentração de NADP e dos inversos destes parâmetros. Para variações de concentração de G-6-P entretanto não foi demonstrada uma cinética simples segundo Michaelis Menten e os dados plotados segundo Hill resultaram em retas cujos coeficientes angulares (n) foram menores que 1 em concentrações baixas de G-6-P. Os autores baseados nos trabalhos de Conway & Koshland com gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (29) e de Dalziel e Engel com glutamato-desidrogenase (30) concluem que uma cooperatividade negativa deve ocorrer entre a enzima e o substrato (G-6-P).

Afolayan & Luzzatto, baseados em seu trabalho realizado em 1967 (20), publicaram em 1971 (31) um estudo sobre cinco variantes genéticas de G-6-PD de eritrócitos humanos mostrando a dependência da velocidade de reação sobre a concentração de NADP. Nenhum

dos 5 tipos da enzima mostrou cinética hiperbólica, ao contrário apresentaram dois estados de afinidade pela coenzima.

Apesar de existirem vários trabalhos sobre a G-6-PD em fungos: Aspergillus niger (32), Neurospora crassa (33, 34, 35), Cândida albicans e Cândida utilis (36, 37, 38), o único trabalho encontrado que desenvolve a cinética da G-6-PD é o de Broad & Shepherd (39) que trabalharam com o fungo Penicillium dupontii.

Estes autores utilizaram uma larga faixa de concentração de substrato e de cofator, que plotados contra a velocidade de reação originaram curvas de saturação sigmoidais. Os valores de n calculados por intermédio do gráfico de Hill foram aproximadamente iguais a 1, indicando não haver um desvio significativo de cinética clássica de Michaelis Menten. Não foi estudado o efeito de metabólitos sobre a velocidade de reação.

Em Polyporus circinatus Fr., fungo apodrecedor de madeiras foi observado um teor relativamente alto de G-6-PD. Como já foi constatada anteriormente a existência de ambas as vias: oxidativa e não oxidativa para o metabolismo da G-6-P neste organismo, e devido ao interesse da G-6-PD como possível enzima reguladora sob a ação de moduladores do metabolismo celular, o presente trabalho foi levado a efeito com a finalidade de estudar algumas características da G-6-PD e a ação de possíveis efetores sobre esta enzima.

2

MATERIAIS E METODOS

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATERIAIS

A D-Glicose-6-fosfato sob a forma sal dissódico, o AMP5' ADP e o ATP também sob a forma de sais dissódicos foram obtidos da Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.

NADP, NAD, NADPH e NADH, sob forma de sais monossódicos e ainda G-1-P, F-1-P e F-1-6-P, também provieram da Sigma Chemical Co.

UTP, CTP e GTP foram obtidos da Nutritional Biochemical Corp. sob a forma de sais dissódicos.

R-5-P proveio da Schwarz Lab. Inc., AMP 3'5'cíclico sob a forma de n-butiril foi obtido da Sigma Chemical Co., assim como o 6-P-gliconato dissódico.

DEAE celulose, da Bio-Rad Laboratories, Sulfato de protamina da Nutritional Biochemical Corporation e p-cloromercuribenzoato da Sigma Chemical Co.

Tôdas as substâncias utilizadas neste trabalho, citadas ou não, estavam designadas por seus fabricantes como quimicamente puras.

2.2 CULTURA DE CÉLULAS

Do fungo Polyporus circinatus Fr, mantido no laboratório em meio sólido tipo Sabouraud a 4°C, foi retirada uma amostra de micélio e colocada em um frasco com 250 ml de meio líquido preparado segundo Markus et alii (40), contendo 0,5% de glucose como única fonte de carbono. Após 48 horas de crescimento a 28°C em agitador rotatório a 100 rpm foram retiradas amostras de micélio e transferidas para frascos de 1.000 ml contendo 250 ml do mesmo meio com 0,5%

de glucose e crescidas por 24 h à mesma temperatura e mesma agitação do inóculo inicial. Todas as soluções foram esterilizadas a 120°C por 20 min. Uma vez crescido o fungo nestes frascos, o micélio foi colhido por filtração em gase, lavado com KCl 0,154M e estocado em congelador a -20°C para ser utilizado posteriormente como fonte de enzima.

2.3 EXTRATO LIVRE DE CÉLULAS

De 10 a 15 gramas de micélio congelado foram trituradas em um gral com areia do mar tratada, de modo a romper o máximo possível as células. O macerado foi suspenso num volume em ml correspondente a 3 vezes o peso do micélio em tampão Tris/HCl 0,05M pH 7,5 contendo EDTA 0,001M e depois centrifugado a 12.000g por 15 minutos em centrífuga refrigerada, obtendo-se por decantação o extrato livre de células.

2.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade enzimática foi medida segundo Kornberg e Horecker (41) pela redução de NADP^+ que resulta num aumento de absorbância a 340µm seguida num espectrofotômetro Beckman DU-2 com registro contínuo. O registrado pôde ser ajustado para uma expansão de escala equivalente até 0,02 unidades de absorbância. NADPH foi estimado usando $6,22 \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ como o coeficiente de extinção a 340µm.

Todos os experimentos foram conduzidos à temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$, atingida no interior da célula contendo a cubeta, após a estabilização do aparelho. Exceção foi feita no caso em que se estudou a temperatura ótima para atividade enzimática.

O sistema de reação foi montado em cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico contendo: 10µmoles de tampão Tris-HCl pH 7,5 (contendo 0,2 µmoles de EDTA), 1 µmol de MgCl_2 , 3 µmoles de G-6-P, 0,2µmoles de NADP

e a enzima em diluições apropriadas (de 72 a 1,5 $\mu\text{g/ml}$), num volume final de 1 ml.

A reação foi sempre iniciada com a adição de NADP. Contrôles sem G-6-P e sem NADP foram feitos não mostrando atividade nestas condições. O aumento da absorbância a 340 μm foi registrado durante 5 minutos tendo permanecido linear nas diluições adequadas.

Uma unidade de enzima, foi definida como a quantidade de desidrogenase capaz de catalizar a formação de 1 micromol de NADPH por minuto, nas condições do ensaio.

A atividade específica foi expressa pela razão entre unidades de enzimas por mg de proteína da mesma solução.

2.5 TÉCNICAS ANALÍTICAS

O conteúdo de proteínas foi determinado pelo método de Lowry et alii (42) e a dosagem de proteínas nas frações eluídas de DEAE celulose foi feita segundo o método de Warburg et al (43).

A dosagem de cloretos nos eluatos foi feita pelo método de Schales et al (44).

O fósforo inorgânico foi determinado pela técnica de Fiske e Subarow (45).

2.6 PREPARAÇÃO DA ENZIMA

As etapas de purificação relacionadas abaixo foram realizadas a uma temp. de 0-4°C e todas as centrifugações foram feitas à velocidade de 12.000 g, caso contrário será assinalado.

Ao extrato livre de células foi adicionada uma solução a 2% de sulfato de protamina (recém-preparada) pH 6.7 numa proporção de 0,25 mg por mg de proteína do extrato. A mistura foi feita gota-a-gota com agitação contínua. Após 10 minutos o precipitado foi separado por centrifugação e desprezado.

O pH do sobrenadante foi corrigido para 7,5 com NaOH 0,1M e então foi saturado até 40% com sulfato de amônio sólido adicionado gradualmente e sob agitação. A solução foi mantida em repouso por 10 minutos e após centrifugação por 15 minutos o precipitado foi removido e ao sobrenadante foi novamente adicionado sulfato de amônia até 55% de saturação. O pH foi mantido em 7,5 com NH_4OH 0,1M e após 10 minutos de repouso nova centrifugação por 15 minutos. O precipitado obtido continha o enzima e foi resuspenso em tampão Tris-HCl 0,05 M-EDTA 0,001M pH 7,5 em 1 volume igual a $\frac{1}{10}$ do volume do extrato cru inicial. Esta solução após diálise por 3 horas contra tampão Tris-HCl 0,005M - EDTA 0,001 M pH 7,5 foi cromatografada em coluna de DEAE - celulose de 27 cm de altura por 0,7 cm de diâmetro equilibrada com tampão igual ao usado para diálise anteriormente.

O fluxo de coluna foi de 0,25 ml/minuto a 4°C e frações de 3 ml foram coletadas em um coletor automático refrigerado Buchler Instruments aplicando-se à coluna um gradiente não linear de NaCl de 0,0 a 0,4M em solução tampão. A enzima foi eluída numa concentração de 0,150 a 0,181M de NaCl e o volume total passado pela coluna foi de 90 ml.

As frações obtidas com maior atividade de enzima não puderam ser concentradas pela adição de sulfato de amônio nem dializadas pois em ambos os casos esta atividade desaparecia.

Três frações de 3 ml cada uma, eluídas por NaCl em torno da concentração de 0,165M foram utilizadas para as determinações e estudos cinéticos propostos pelo trabalho.

Na faixa de concentração de substrato e coenzima de $10^{-4}M$ a $10^{-2}M$ os valores de K_m foram determinados segundo o método de Lineweaver & Burk modificado por Dixon (46).

Na faixa de concentração de $10^{-7}M$ a $10^{-2}M$ devido à grande variação houve uma certa dificuldade na análise dos resultados, sendo absolutamente necessário que se trabalhe em escalas logarítmicas.

Neste caso se faz necessária uma transformação adequada da equação de Michaelis Menten modificada por Lineweaver & Burk (1).

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V} \times \frac{1}{s} + \frac{1}{V} \quad (1)$$

O gráfico de $\frac{1}{v}$ em função de $\frac{1}{s}$ dá como resultado uma reta com as características indicadas na fig. 1

Se fôr feito um gráfico de $(\frac{1}{v} - \frac{1}{V})$ em função de $\frac{1}{s}$, ter-se-á uma reta passando pela origem (fig. 2)

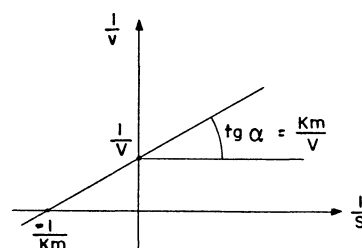


Fig. 1

$$\frac{1}{v} - \frac{1}{V} = \frac{K_m}{V} \times \frac{1}{s}$$

Sendo ambos os membros maiores que zero pode-se tomar o logarítmo, tal que:

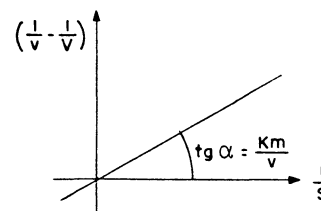


Fig. 2

$$\log \left(\frac{1}{v} - \frac{1}{V} \right) = \log \frac{1}{V} + \log K_m + \log \frac{1}{s}$$

ou:

$$\log \left(\frac{v}{V-v} \right) = - \log K_m + \log s \quad (2)$$

Um gráfico de $\log \left(\frac{v}{V-v} \right)$ contra $\log s$, para uma reação que siga a cinética de Michaelis Menten, deverá ser linear com uma inclinação igual a 1, devendo ser observado que $v = V/2$, tem-se:

$$\log \left(\frac{V/2}{V-V/2} \right) = 0 = -\log K_m + \log s$$

$$\log K_m = \log s$$

Todavia os resultados apresentados para os gráficos de $\log \left(\frac{v}{V-v} \right)$ contra $\log s$ indicaram inclinações menores que 1. Estas discrepâncias com relação à cinética de Michaelis Menten levaram a considerar uma forma mais generalizada dessa equação, ou seja, a equação empírica de Hill (47, 48, 49)

$$\log \left(\frac{v}{V-v} \right) = n \log s - \log K$$

onde: v = velocidade inicial de reação

V = velocidade máxima de reação

n = nº de sítios aos quais o substrato pode ligar-se ou coeficiente de interação entre sítios.

K = constante

Para utilização prática uma forma análoga à proposta por Hill é mais comumente empregada (50).

$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{1}{1 + \left(\frac{K}{s} \right)^n}$$

donde: $\log \left(\frac{v}{V-v} \right) = n \log s - n \log K$ (3)

A equação (3) foi empregada no presente trabalho para os cálculos dos valores de \underline{n} e \underline{K} dos gráficos de $\log \left(\frac{v}{\bar{v}-v} \right)$ contra $n \log s$.

Os valores de K_{s1} e K_{s2} foram calculados segundo a equação apresentada por Luzzatto (31).

3

RESULTADOS

Purificação da enzima

A tabela I mostra que a desidrogenase da G-6-P foi purificada 69,4 vezes com um rendimento de 21,2%. A figura nº 1 ilustra a separação cromatográfica da enzima em coluna de DEAE-celulose.

A enzima purificada foi mantida à temperatura de 0° C durante 9 dias, tendo decrescido gradualmente sua atividade até atingir 30% da inicial no fim do período mencionado. Na ausência de EDTA ou NaCl a enzima não se manteve ativa por mais de 24 horas.

Presença de enzimas interferentes

A presença de enzimas que pudessem interferir com o ensaio da G-6-P desidrogenase foi determinada na etapa final da purificação e não foram encontradas nem 6-P Gliconato desidrogenase, nem G-6-P fosfatase, estando ausentes das preparações ou abaixo de níveis detectáveis.

Especificidade pela coenzima

A enzima purificada mais de 60 vezes mostrou-se totalmente específica para NADP^+ como coenzima, não reduzindo o NAD^+ em níveis detectáveis pelo espectrofotômetro registrador mesmo quando se utilizava a "full-scale" do aparêlho.

Efeito da temperatura

Como mostra a figura 2 a atividade enzimática é máximo em torno de 30°C, decrescendo depois com o aumento de temperatura até alcançar 29,1% da atividade inicial, a 50°C.

Efeito do pH

Para a determinação do efeito do pH sôbre a velocidade de reação foram usados os seguintes tampões: citrato 0,1M pH 3,5 - 6,5; glicilglicina 0,1M pH 7,0 a 7,7; Tris - HCl 0,1M pH 7,5 - 9,0, glicina - NaOH 0,1M pH 9,0 - 10,6. A variação de pH contra velocidade de reação está demonstrada na fig. 3.

Ativação por cátions

A G-6-PD de P.circinatus conforme está expresso na tabela II apresentou 38% de ativação na presença de íons Mg^{++} 2mM, 10,2% na presença de Mn^{++} 1mM e foi inibida pelos íons: Zn^{++} , Co^{++} e Cu^{++} .

Efeito de inibidores de grupamentos SH^-

Foram testados a Iodoacetamida e o p-cloromercuribenzoato, ambos inibiram consideravelmente a atividade da enzima, comprovando a dependência desta com relação a grupos sulfidrilas (SH), para catalizar a reação. A porcentagem de inibição está expressa na tabela III.

Constantes cinéticas para o substrato e coenzima

As fig. 4 e 5 mostram os gráficos da velocidade inicial de reação contra altas concentrações de substrato (G-6-P) e de coenzima respectivamente. Os valores de K_m obtidos foram $6,8 \times 10^{-4}M$ para G-6-P e $1 \times 10^{-4}M$ para NADP.

Quando se ampliou a faixa de concentração do substrato e da coenzima foram obtidas curvas sigmoidais na forma logarítmica (fig. 6 e 7).

Dos dados acima foram feitos gráficos segundo Hill, observando-se a existência de 2 retas quando a variável foi a G-6-P tanto em pH 8,0 (fig. 8) como em pH 6,7. Os valores de K_{s1} para baixas concentrações e de K_{s2} para altas concentrações, assim como os valores de n em pH 8,0 e 6,7 estão expressos na tabela IV.

Efeito de metabólitos sobre a reação da desidrogenase da G-6-P

Como está ilustrado na tabela V, UTP, ATP e AMP 3'5' ativaram a reação da enzima, a F-1-6-P, Pi e acetil CoA não exerceram qualquer efeito sobre sua atividade e os demais metabólitos testados inibiram, em maior ou menor proporção, a atividade da glucose-6-fosfato desidrogenase.

Efeito do ATP sobre a atividade enzimática

Conforme está ilustrado na tabela VI, ATP na concentração final de 2mM, no pH ótimo da enzima não exerceu efeito sobre a atividade da enzima, sendo que em concentração 4mM o efeito é levemente inibitório. Em pH abaixo do ótimo ATP 4mM causou inibição total.

A figura 9 mostra as medidas de velocidade de reação para concentrações variáveis de G-6-P na presença de ATP 2mM e 4mM em pH 8,0.

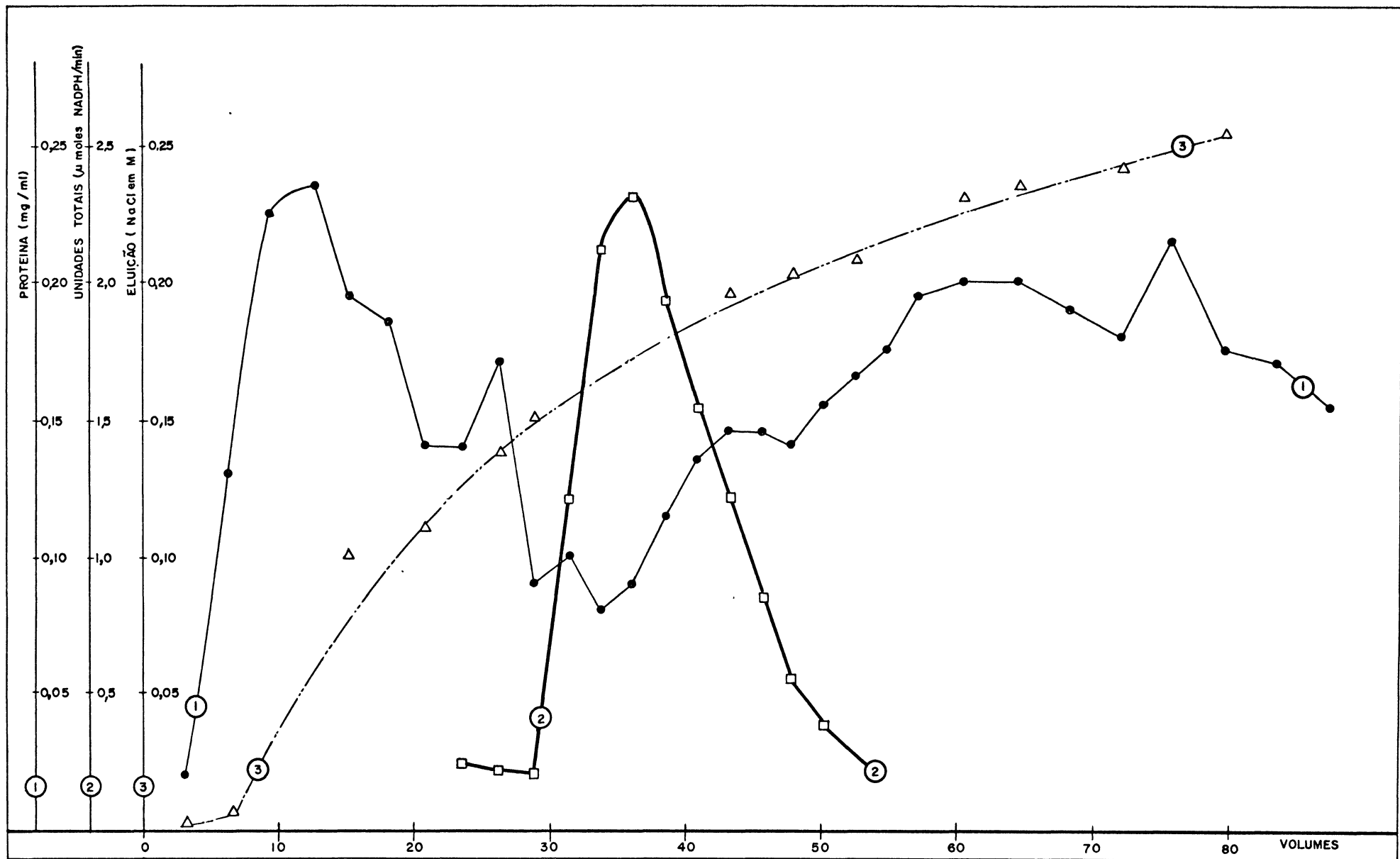
Os valores de n determinados em presença do metabólito em concentrações altas da G-6-P apresentaram valores menores que 1,0 sendo este efeito acentuado em pH 6,7 (fig. 10A e fig. 10B):

Efeito de NADPH e NADH sôbre a atividade enzimática

Determinações da velocidade de reação contra concentrações variáveis de G-6-P foram realizadas na presença de de duas concentrações de cada uma das coenzimas reduzidas (fig. 11A e 12A). Valores de n foram determinados para ambas concentrações de cada uma das coenzimas reduzidas na faixa de altas concentrações de G-6-P (fig. 11B e 12B) sendo observado que os valores de n decresceram mas não de modo significativo em relação ao obtido na mesma faixa de G-6-P na ausência dos coenzimas.

TABELA 1 - PURIFICAÇÃO DA G-6-P DESIDROGENASE

Fração	Volume Total (ml)	Unidades de Enzima/ml	Unidades Totais	Proteína mg/ml	Atividade Específica	Rendimento (%)	Purificação
Extrato livre de células	40	1,93	77,2	14,50	0,133	-	-
Sulfato de protamina 2%	42	1,28	53,7	5,96	0,215	69,5	1,61
Sulfato de amônia 40 - 55%	4,5	3,86	17,3	7,60	0,508	22,4	3,81
Coluna de DEAE-celulose	8,5	1,93	16,4	0,209	9,234	21,2	69,42



- (1) — PROTEINA ELUIDA (mg/ml)
 (2) — ATIVIDADE DA ENZIMA — UNIDADES TOTAIS DOS VOLUMES COLETADOS
 (3) — CONCENTRAÇÃO DO ELUENTE

L E G E N D A

Fig.1-CROMATOGRAPHIA EM COLUNA DE DEAE-Celulose-Eluição com NaCl
 Sistema de reação: 10 μmoles de tampão Tris-HCl pH 7,5 (contendo 0,2 μmoles de EDTA) 1 μmol de MgCl₂; 2 μmoles de G-6-P; 0,3 μmoles de NADP; 1,5 μg de proteína e H₂O destilada para completar o volume de 1 ml.

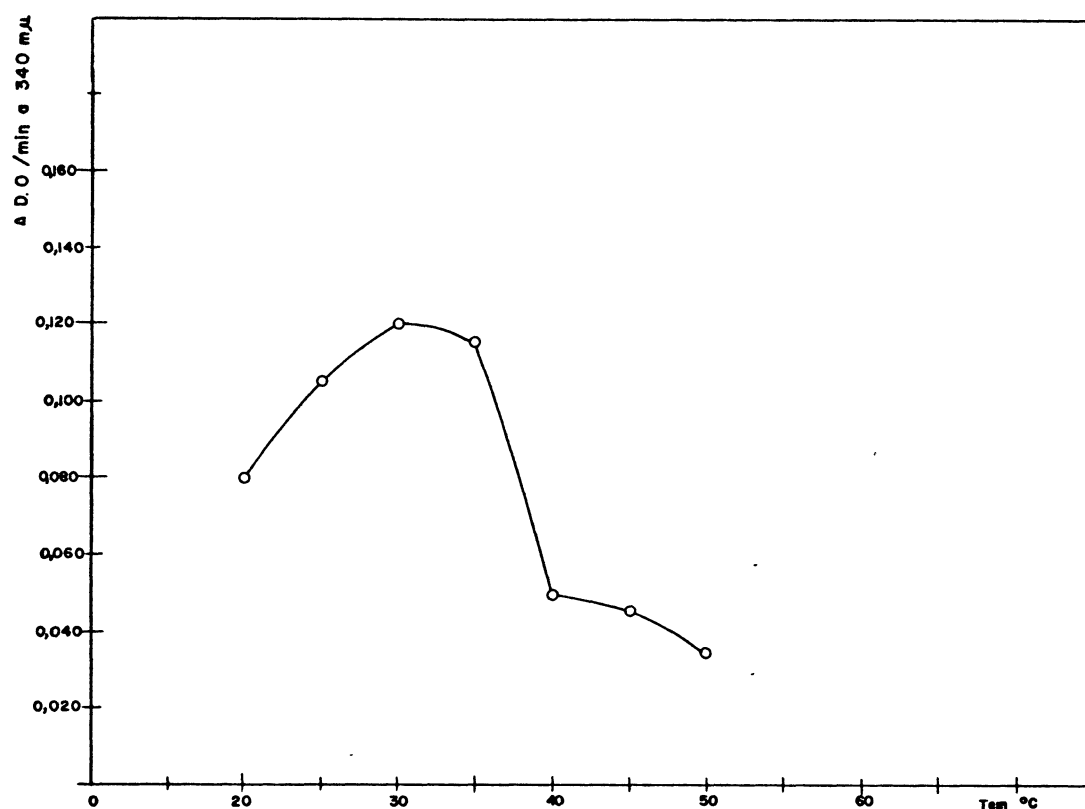


Fig.2 - CURVA DE VARIAÇÃO DA ATIVIDADE COM TEMPERATURA

Sistema de reação: 10 μmoles de tampão Tris-HCl pH 7,5 (contendo 0,2 μmoles de EDTA) 1 μmol de MgCl₂; 2 μmoles de G-6-P; 0,3 μmoles de NADP; 1,0 μg de proteína e H₂O destilada para completar o volume de 1 ml.

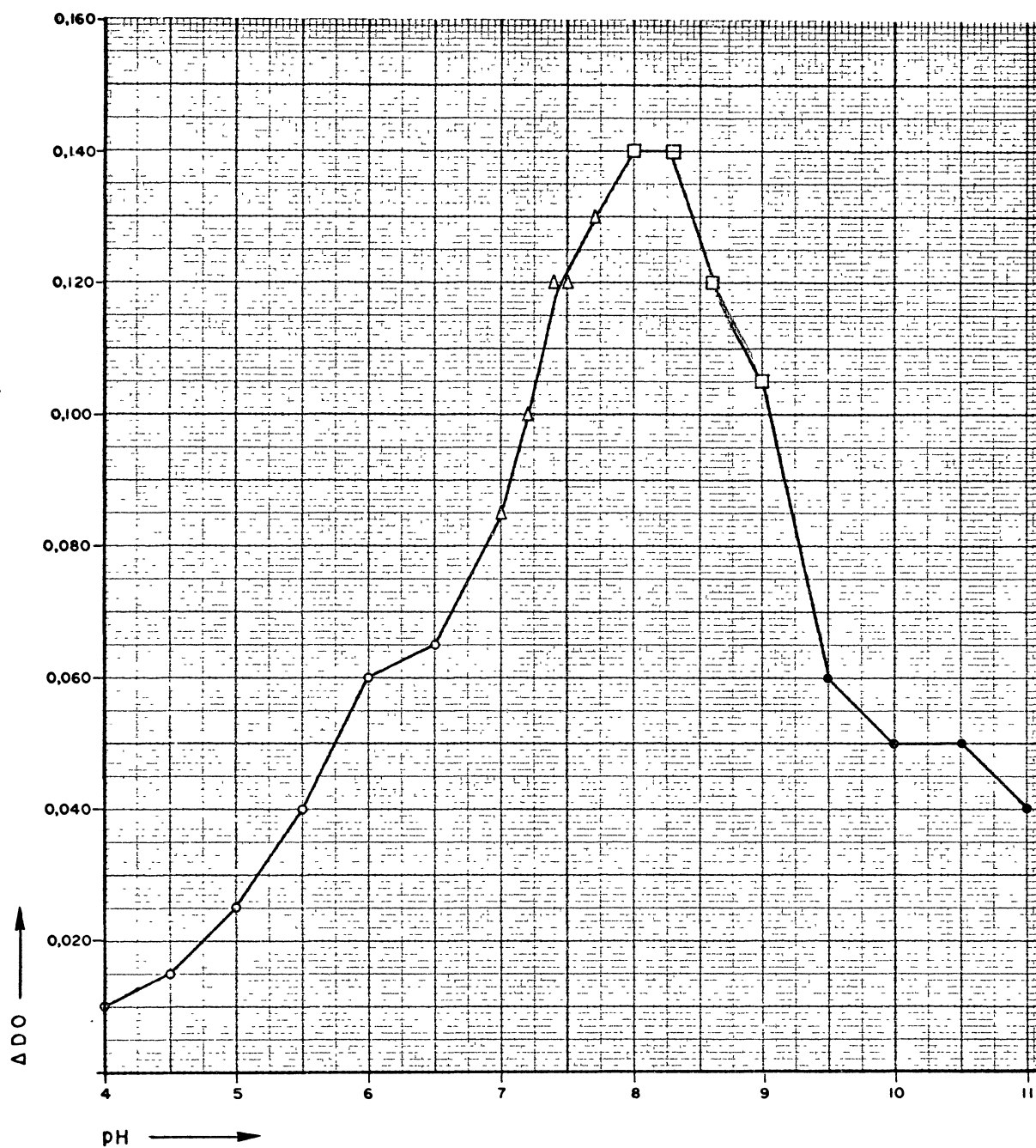


Fig. 3 - Efeito do pH sobre a atividade da enzima

Sistema de reação 20 μ moles de tampão (○—○ citrato, Δ—Δ glicilglicina, □—□ Tris-HCl, ●—● glicina-NaOH), 1 μ mol de $MgCl_2$, 2 μ moles de G-6-P, 0,3 μ moles de NADP, 1,0 μ g de proteína e H_2O dest. para completar o vol de 1 ml

TABELA II

Íon	Concentração Molar	μMoles de NADPH Formados/min.	Atividade %
Nenhum	-	0,0098	72,0
Mg ⁺⁺	1 x 10 ⁻³	0,0132	97,1
Mg ⁺⁺	2 x 10 ⁻³	0,0136	100,0
Mn ⁺⁺	1 x 10 ⁻³	0,0108	80,0
Zn ⁺⁺	1 x 10 ⁻⁴	0,0025	18,3
Fe ⁺⁺	1 x 10 ⁻³	0,0036	26,5
Cu ⁺⁺	1 x 10 ⁻⁴	0,0015	11,0
Co ⁺⁺	1 x 10 ⁻³	0,0020	14,7

Tabela II - Efeito de íons sobre a atividade enzimática
 Sistema de reação: 10 μmoles de tampão Tris-HCl 0,05M pH 8,0 (com 0,2 μmoles de EDTA); concentrações variáveis de diferentes cations; 2 μmoles de G-6-P; 0,3 μmoles de NADP; 1,0 μg de proteína e H₂O para completar 1 ml.

TABELA III

Inibidor	Concentração Molar	μ Moles de NADPH Formados/min.	Inibição %
Nenhum	-	0,0136	-
Iodoacetamida	1 x 10 ⁻³	0,0032	77,0
Paracloromercuribenzoato	1 x 10 ⁻⁵	0,0024	82,4

Tabela III - Efeito de inibidores de grupamentos SH sobre a atividade enzimática.

Sistema de reação: 10 μmoles de tampão Tris-HCl 0,05M pH 8,0 (com 0,2 μmoles de EDTA); 1 μmol de MgCl₂; 2 μmoles de G-6-P, 0,3 μmoles de NADP; 1,0 μg de proteína; 1 μmol de Iodoacetamida; 0,01 μmoles de p-cloromercuribenzoato; e H₂O destilada para completar 1 ml.

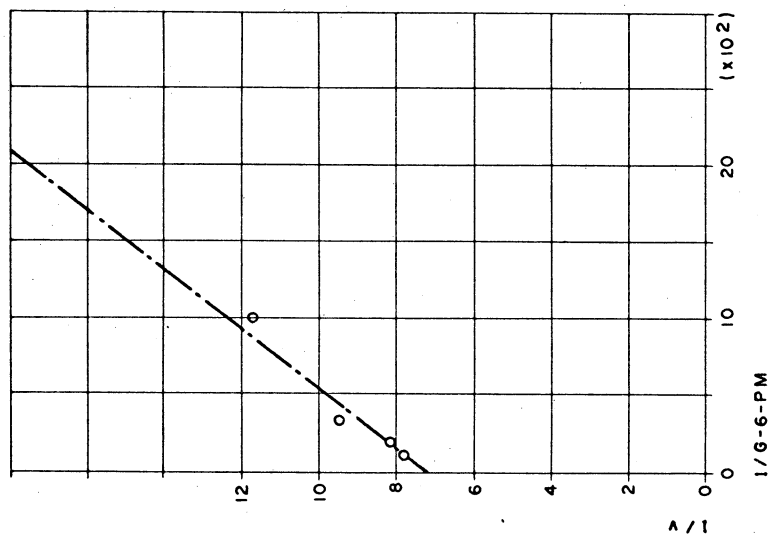


Fig. 4 - Gráfico dos inversos da saturação da G-6-P desidrogenase com G-6-P.
Sistema de reação: 10 μ moles de tampão Tris-HCl 0,05 M (com 0,2 μ moles de EDTA); 1 μ mol de $MgCl_2$; 0,3 μ moles de NADP; G-6-P variando de 10^{-2} a 10^{-3} M; 1,0 μ g de proteína e H_2O dest. para completar 1 ml.

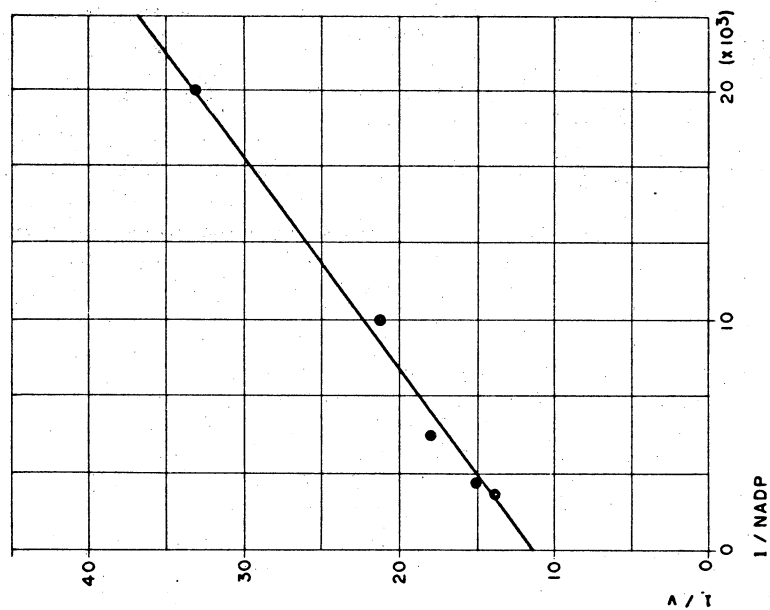


Fig. 5 - Gráfico dos inversos da saturação da G-6-P desidrogenase com NADP.
Sistema de reação: 10 μ moles tampão Tris-HCl 0,05 M (com 0,2 μ moles de EDTA); 1 μ mol de $MgCl_2$; 2 μ moles de G-6-P; NADP variando de 10^{-3} a 10^{-4} M; 1 μ g de proteína e H_2O dest para completar 1 ml.

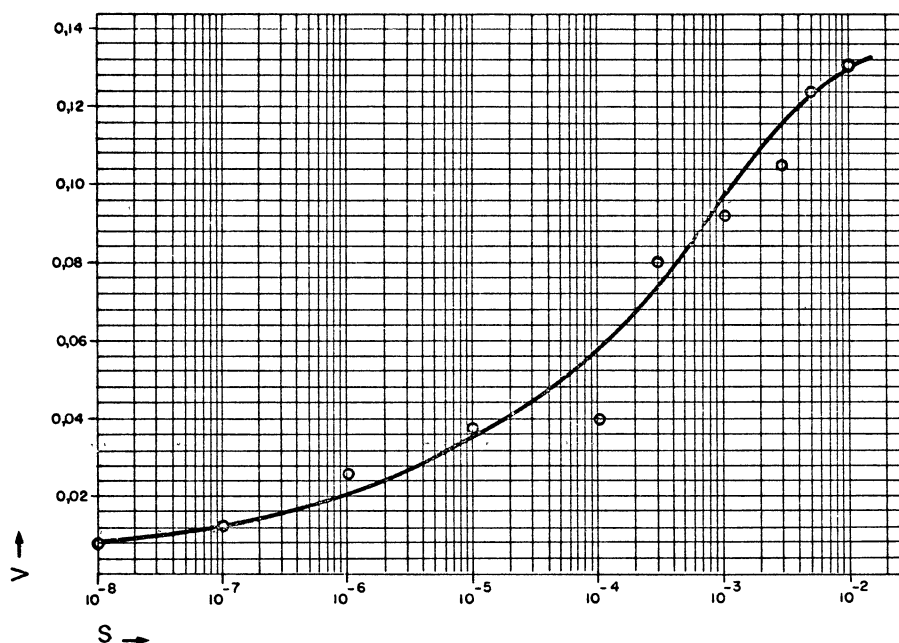


Fig 6 - CURVA DE SATURAÇÃO PARA A GLUCOSE - 6 - FOSFATO DESIDROGE- NASE COM G - 6 - P
Sistema de reação 10 μ moles de tampão Tris - HCl 0,05 M pH 8,0 (com 0,2 μ moles de EDTA) 1 μ mol de $MgCl_2$, 0,3 μ moles de NADP, 1,0 μ g de proteína, concentrações variáveis de G-6-P e H_2O dest para completar 1 ml
Obs S = G-6-P , a velocidade inicial V está expressa em $\Delta D O$.

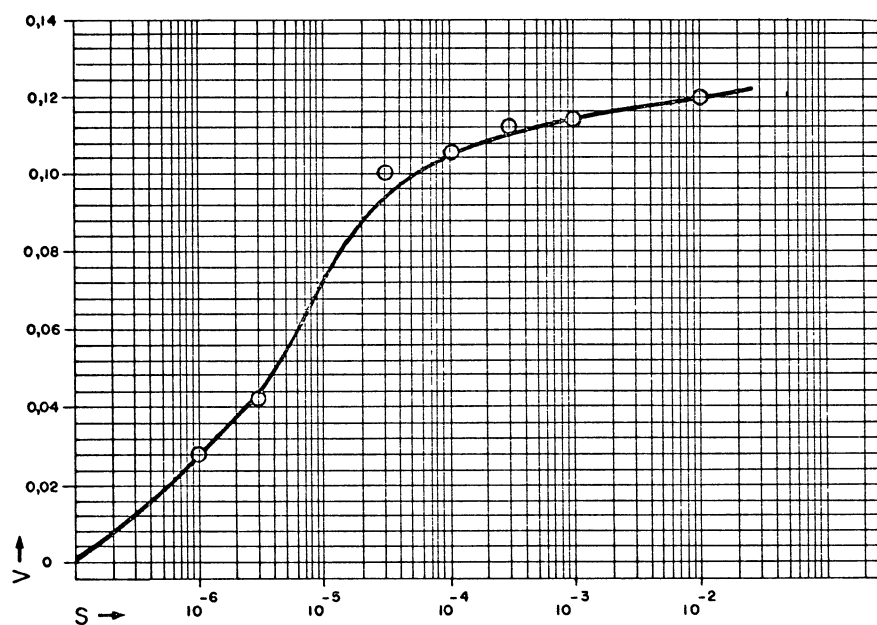


Fig 7 - CURVA DE SATURAÇÃO PARA A GLUCOSE - 6 - FOSFATO DESIDROGE- NASE COM NADP
Sistema de reação 10 μ moles de tampão Tris - HCl 0,05 M pH 8,0 (contendo 0,2 μ moles de EDTA), 1 μ mol de $MgCl_2$, 2 μ moles de G-6-P, 1,0 μ g de proteína e concentrações variáveis de NADP e H_2O dest para completar 1 ml
Obs S = NADP A velocidade inicial V está expressa em $\Delta D O$

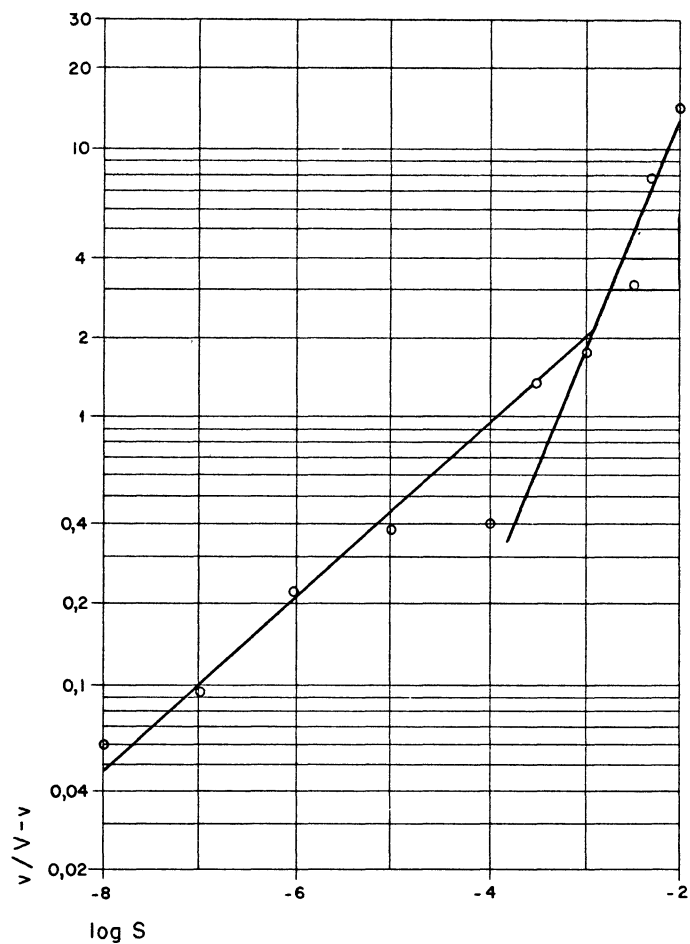


Fig 8 - Gráfico de Hill da saturação da G-6-P desidrogenase com G-6-P a pH 8,0

Sistema de reação 10 μ moles de tampão Tris-HCl 0,05 M pH 8,0 (com 0,2 μ moles de EDTA) 1 μ mol de $MgCl_2$, 0,3 μ moles de NADP, 1,0 μ g de proteína e concentrações variáveis de G-6-P e H_2O dest para completar 1 ml

Obs. S: G-6-P M a velocidade inicial V esta expressa em $\Delta D O$
 $n_1 = 0,40$
 $n_2 = 0,99$

TABELA IV

H	KS_1	n_1	KS_2	n_2
pH 8,0	$1,5 \times 10^{-3} M$	0,40	$6,41 \times 10^{-4} M$	0,99
pH 6,7	$1,15 \times 10^{-3} M$	0,32	$8,09 \times 10^{-4} M$	1,01

Tabela IV - Efeito da ATP sobre a atividade enzimática.
 Sistema de reação: 10 μ moles de tampão Tris-HCl pH 8,0 ou tampão Imidazol pH 6,7 (com 0,2 μ moles de EDTA); 1 μ mol de $MgCl_2$; 0,3 μ moles de NADP; 1 μ g de proteína, ATP nas concentrações 2 e 4m M; G-6-P em concentrações variáveis e H_2O destilada para completar 1ml.

METABÓLITOS	CONCENTRAÇÃO MOLAR	μMOLES DE NADPH FORMADOS/MIN.	ATIVIDADE %
Nenhum	-	0,0185	100,0
F-1-6P	2×10^{-3}	0,0184	99,6
G-1-P	2×10^{-3}	0,0172	93,0
F-6-P	2×10^{-3}	0,0165	89,1
R-5-P	2×10^{-3}	0,0091	49,2
PO_4^{--}	2×10^{-3}	0,0188	101,6
GTP	2×10^{-3}	0,0125	100,0
GTP	2×10^{-3}	0,0024	100,0
UTP	2×10^{-3}	0,0223	120,5
ATP	1×10^{-3}	0,0192	103,7
ADP	2×10^{-3}	0,0104	56,2
AMP 5'	2×10^{-3}	0,0128	69,1
AMP 3'5'	8×10^{-4}	0,0209	113,0
NADPH	$0,64 \times 10^{-3}$	0,0170	91,9
NADH	$0,90 \times 10^{-4}$	0,0130	70,3
Acetil - Coa	1×10^{-3}	0,0187	101,0

Tabela V - Efeito de metabólitos sobre a atividade da G-6-P de hidrogenase.

Sistema de reação: 10 μmoles de tampão Tris-HCl 0,05 M pH 8,0 (contendo 2 μmoles de EDTA) 1 μmol de MgCl_2 ; 0,3 μmoles de NADP; 2 μmoles de G-6-P; 1,5 μg de proteína; concentrações variáveis dos diversos metabólitos e H_2O destilada suficiente para completar 1 ml.

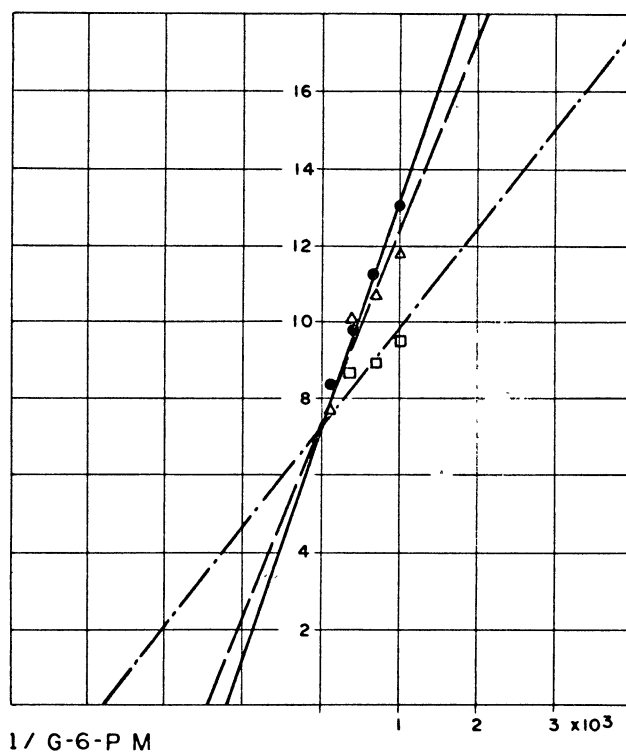


Fig. 9 - Efeito do ATP sobre a atividade enzimática na faixa de concentrações altas de G-6-P

Sistema de reação: 10 μ moles de tampão Tris-HCl 0,05 M pH 8,0 (contendo EDTA), 1 μ mol de $MgCl_2$, 0,3 μ moles de NADP, 1,0 μ g de proteína, concentrações variáveis de G-6-P, ATP 0,0mM (—Δ—), 2 mM (—□—) e 4 mM (—●—), e H_2O dest para completar 1 ml

TABELA VI

CONCENTRAÇÃO DE ATP	μ MOLES DE NADPH formados/ml/minuto	
	pH 6,7	pH 8,0
Nenhum	0,0209	0,0225
2m M	0,0193	0,0225
4m M	0,0000	0,0209

Tabela VI - Efeito da ATP sobre a atividade enzimática.

Sistema de reação: 10 μ moles de tampão Tris-HCl pH 8,0 ou tampão Imidazol PH 6,7 (com 0,2 μ moles de EDTA); 1 μ mol de MgCl₂; 0,03 μ moles de NADP; 1 μ g de proteína, ATP nas concentrações 2 e 4m M; G-6-P em concentrações variáveis e H₂O destilada para completar 1 ml.

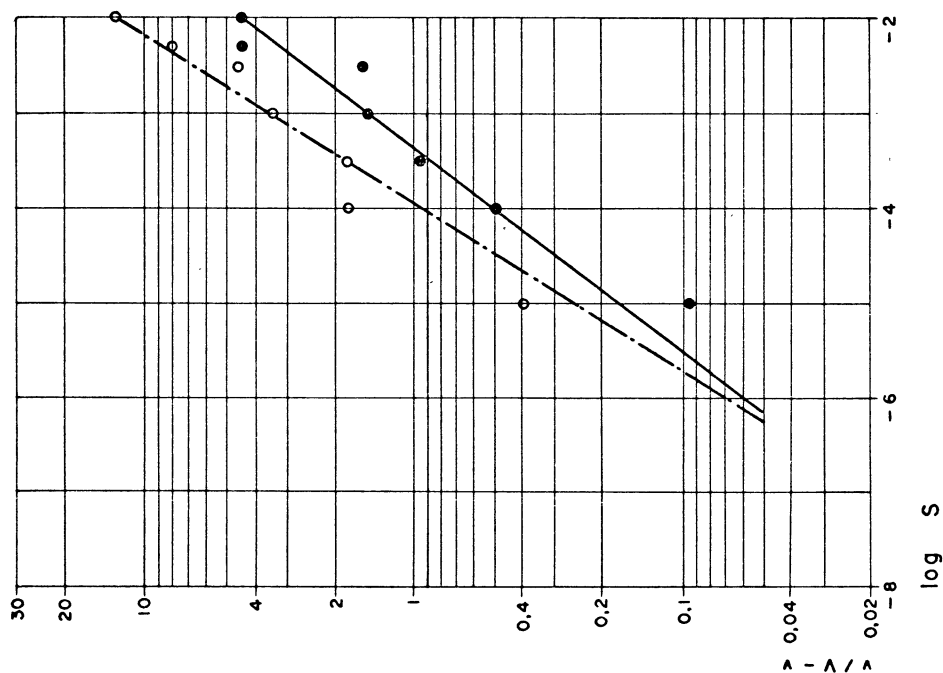


Fig. 10 A - Gráfico de Hill do efeito de ATP 2 mM sobre a atividade enzimática a diferentes pH.
Sistema de reação: 10 μ moles de tampão Tris-HCl 0,05M pH 8,0 (○---○) ou Imidazol 0,05 M pH 6,7 (●---●); 1 μ mol de $MgCl_2$; 0,3 μ moles de NADP; 1 μ g de proteína; concentrações variáveis de G-6-P e H_2O para completar 1 ml.
 $n_H = 0,65$
 $n_0 = 0,55$

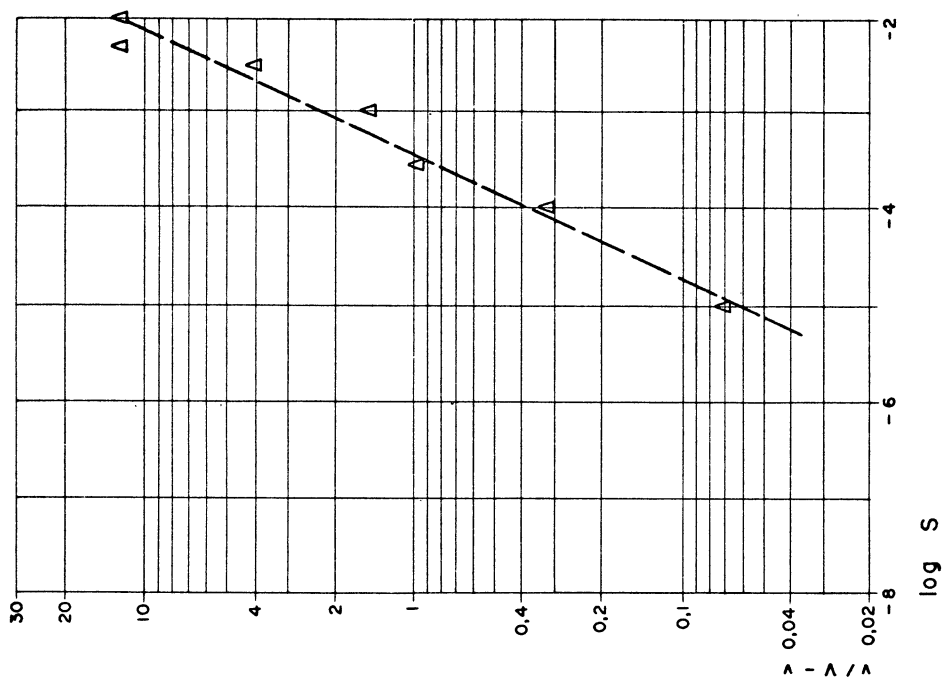


Fig. 10 B - Gráfico de Hill do efeito de ATP 4 mM sobre a atividade enzimática a pH 8,0
Sistema de reação: 10 μ moles de tampão Tris-HCl 0,05 M pH 8,0; 1 μ mol de $MgCl_2$; 0,3 μ moles de NADP; 1 μ g de proteína; concentrações variáveis de G-6-P, 4 mM de ATP e H_2O para completar 1 ml.
 $n = 0,71$

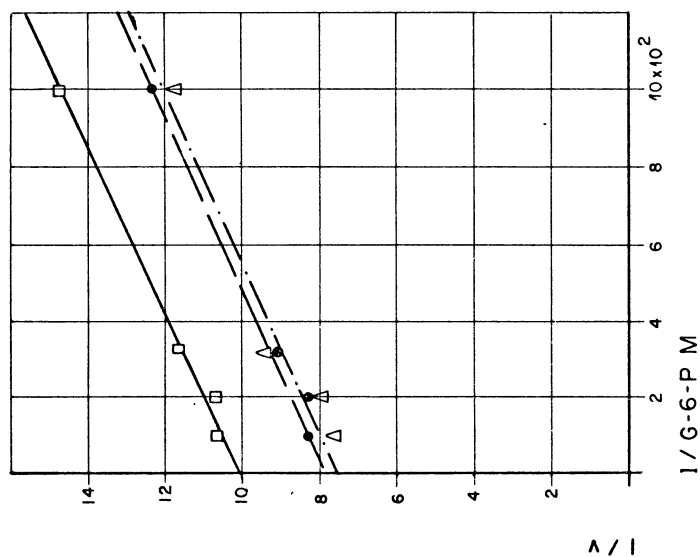


Fig. II A - Efeito de NADH sobre a atividade enzimática.

Sistema de reação: 10 μ moles de tampão Tris-HCl 0,05 M p 8,0 (com 0,2 μ moles de EDTA), 1 μ mol de $MgCl_2$; 0,3 μ moles de NADP, 1,0 μ g de proteína; NADH nas concentrações, 0,0 mM (—•—), 0,04 mM (—•—) e 0,09 mM (—•—) concentrações variáveis de G-6-P (10^{-2} a 10^{-3} M) e H_2O dest. para completar 1 ml

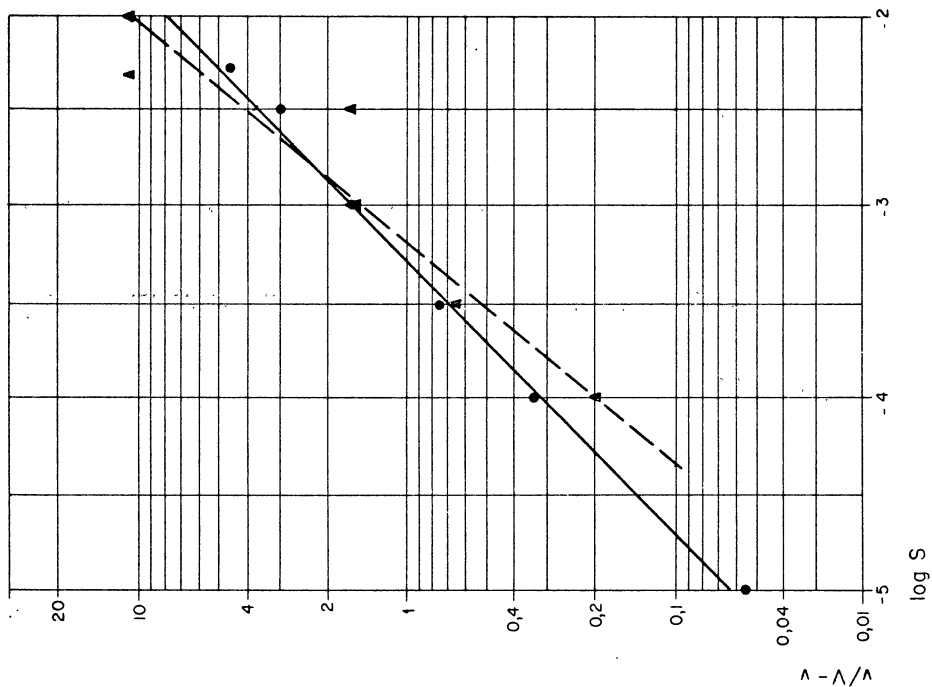


Fig. II B - Gráfico de Hill do efeito de NADH sobre a atividade enzimática.

Sistema de reação: 10 μ moles de tampão Tris-HCl 0,05 M p 8,0 (com 0,2 μ moles de EDTA), 1 μ mol de $MgCl_2$; 0,3 μ moles de NADP, 1,0 μ g de proteína; NADH nas concentrações, 0,04 mM (—•—), 0,09 mM (—•—) concentrações variáveis de G-6-P (10^{-2} a 10^{-3} M) e H_2O dest. para completar 1 ml.

$n_A = 0,84$

$n_B = 0,71$

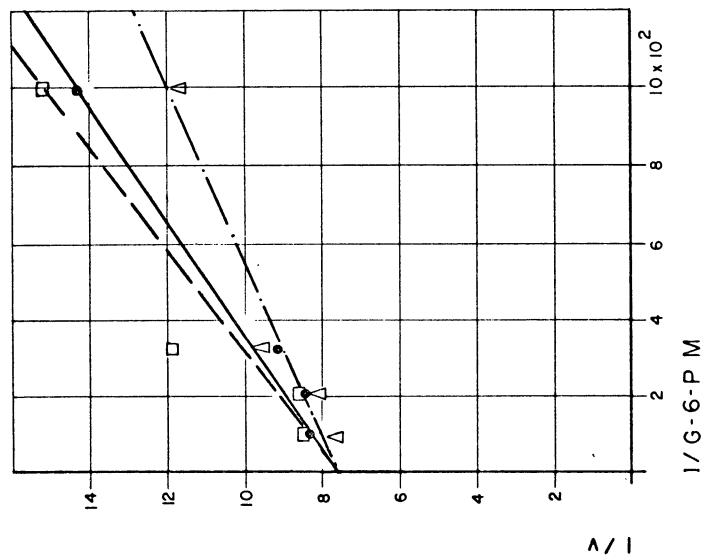


Fig. 12 A - Efeito do NADPH sobre a atividade enzimática.
Sistema de reação: 10 μ moles de tampão Tris-HCl 0,05 M pH 8,0 (com 0,2 μ moles de EDTA) 1 μ mol de $MgCl_2$; 0,3 μ moles de NADP, 1,0 μ g de proteína; NADPH nas concentrações, 0,0mM (—●—); 0,032 mM (—□—) e 0,064 mM (—●—) concentrações variáveis de G-6-P (10^{-2} a 10^{-3} M) e H_2O dest. para completa 1 ml.

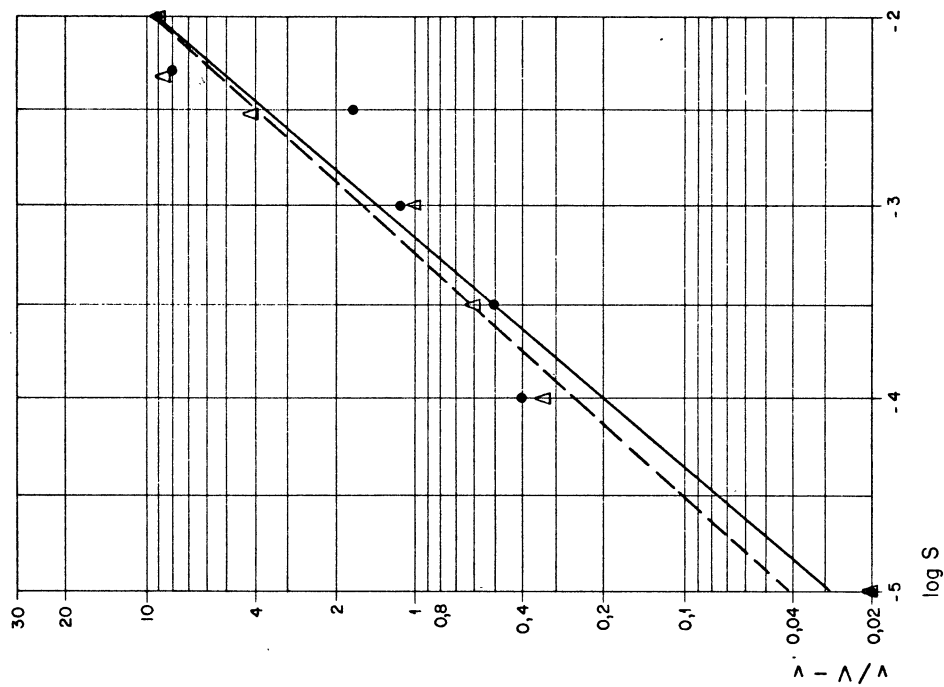


Fig. 12 B - Gráfico de Hill do efeito de NADPH sobre a atividade enzimática.
Sistema de reação: 10 μ moles de tampão Tris-HCl 0,05 M pH 8,0 (com 0,2 μ moles de EDTA) 1 μ mol de $MgCl_2$; 0,3 μ moles de NADP; 1,0 μ g de proteína; NADPH na concentrações, 0,032 mM (—Δ—) e 0,064 mM (—●—) concentrações variáveis de G-6-P (10^{-2} a 10^{-3} M) e H_2O dest. para completa 1 ml.
 $n_{\Delta} = 0,80$
 $n_{\bullet} = 0,85$

4

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

A instabilidade da enzima diminuiu após a eluição da coluna de DEAE celulose desde que no meio houvesse EDTA e NaCl. Broad & Shepherd (39) observaram também que a estabilidade da enzima de P.dupontii foi protegida por EDTA.

A atividade enzimática apareceu em sistemas aos quais nenhum íon foi adicionado, portanto é impossível concluir que o sistema enzimático tenha requerimento por íons. É possível porém que tal requerimento exista e que os íons sejam fortemente ligados à molécula de proteína não podendo ser removidos pelas condições de diálise e quelação empregadas na purificação da enzima. Neste caso o sistema ativado por cátions estaria mais próximo ao estado fisiológico da célula.

Conforme mostra a tabela II os efeitos de íons sobre a enzima de P.circinatus são comparáveis aos efeitos observados sobre as enzimas de E.coli (63) e de levedura (52) com exceção do que se refere a Ca^{++} e Ba^{++} nesta última, são também comparáveis aos resultados encontrados para a G-6-PD de outros fungos: (32, 33, 39), que também não demonstraram requerimento específico por íons.

Os estudos cinéticos realizados foram conduzidos em pH 8,0 no qual o sistema enzimático mostrou maior velocidade de reação, como aliás a maioria das G-6-PD de diversas fontes (10, 32, 33, 36, 63) que têm pH ótimo na faixa alcalina entre 8 e 9.

Quanto aos inibidores de grupamentos sulfidríla (tabela III): Iodoacetamida e p-cloromercuribenzoato, tiveram grande efeito sobre a atividade da enzima indicando a presença de grupamentos SH^- nos sítios ativos, efeito semelhante ao observado com a enzima de eritrócitos humanos (7,65) e com Leuconostoc mesenteroides (51).

Como se pode observar na fig. (6 e 7) quando foi feita uma variação ampla nas concentrações de substrato obteve-se curvas de saturação semelhantes às obtidas por Broad & Shepherd (39). A análise da fig. 8 (gráfico de Hill para G-6-P) indica que a afinidade da G-6-PD de P.circinatus pelo substrato varia com a concentração do mesmo tendo sido possível determinar duas constantes de dissociação para o complexo enzima-substrato: uma para baixas e outra para altas concentrações de substrato, K_{s_1} e K_{s_2} respectivamente.

Fato semelhante foi observado por Luzzatto (20, 31) em enzima de eritrócitos humanos com relação à variação de NADP.

O valor de K_{s_2} é muito próximo ao K_m aparente da equação de Michaelis-Menten calculado para concentrações altas de G-6-P. Deve-se no entanto ponderar que os resultados obtidos a baixas concentrações de G-6-P estão mais sujeitos às limitações técnicas de medidas não podendo ser tomados como absolutos.

O abaixamento do pH de 8,0 para 6,7 não apresentou efeito considerável sobre estas constantes e nem sobre a velocidade máxima (tabela IV). A forma do gráfico de Hill também não foi alterada assim como os valores de n não sofreram alteração significativa podendo-se concluir que esta diferença de pH não é suficiente para alterar de modo apreciável a cinética de reação.

Os nucleotídeos trifosfatos não inibiram a reação da G-6-PD nas condições do ensaio, ao contrário o UTP teve efeito ativador assim como o ATP, aumentando a atividade da enzima em 20% e 3% respectivamente. Também em P.dupontii (39) não foi observado efeito inibidor do ATP nas condições de pH ótimo para a enzima. No entanto, em pH 6,7 (tab. IV) o ATP inibe a atividade enzimática, o que coincide com a observação de Avigad (14) para a enzima de levedura.

O ADP e o AMP apresentaram um efeito inibidor mais eficaz que os outros nucleotídeos trifosfatos. Por sua vez a R-5-P foi mais eficaz na inibição que os outros ésteres fosfóricos testados. Estes resultados diferem dos obtidos por Horne et alii (26), embora seja difícil correlacionar os dados obtidos com os de enzimas de diferentes origens devido à discrepância dos resultados descritos na literatura (8, 16, 17, 18, 19, 24, 25, 26).

O fato da R-5-P inibir a G-6-PD indicaria que as contrações deste metabólito, que é um produto da via, estariam exercendo um efeito regulador sobre a enzima de maneira a controlar o fluxo da G-6-P através do ciclo das pentoses-fosfato.

Ao contrário do descrito na literatura (64) o P_i não apresentou efeito sobre a atividade da G-6-PD de P. circinatus.

O efeito do ATP quando se varia as concentrações de G-6-P (fig. 9) é contraditório sendo observado um certo estímulo na concentração de 2mM e inibição na concentração de 4mM.

Luzzatto (20) cita ter observado fato semelhante com relação ao NADPH em baixas concentrações da coenzima.

Os valores de \bar{n} na presença de ambas as concentrações de ATP decresceram significativamente em relação ao sistema sem ATP na faixa de altas concentrações de G-6-P.

O abaixamento do pH de 8,0 para 6,7 aumentou o efeito do ATP sobre a velocidade de reação sendo que a concentração 4mM neste pH provocou o desaparecimento da atividade enzimática e a concentração 2mM provocou um maior decréscimo do valor de \bar{n} .

Quanto à inibição por piridino-nucleotídeos reduzi dos observa-se pela fig. (11 e 12) que nas concentrações utilizadas o efeito inibidor de NADPH e NADH não foi marcante pelo menos na faixa de altas concentrações de G-6-P. As enzimas de eritrócitos humanos (20) e de E.coli (8) porém mostraram-se mais sensíveis ao efeito dos inibidores em condições semelhantes às utilizadas no presente trabalho.

O fato da V_{max} permanecer praticamente inalterada enquanto o K_m se alterou na presença de NADPH, indica que este se comportaria como um inibidor competitivo com relação à G-6-P, enquanto que o NADH por alterar tanto a V_{max} como o K_m , seria um inibidor não competitivo, de modo semelhante ao observado por Sanwall com enzima de E.coli (8).

Usando concentrações cem vezes as utilizadas no presente caso, Broad & Shepherd (39) não observaram nenhum efeito de NADPH sobre a enzima de Penicillium dupontii o que indica comportamento distinto de enzimas de diferentes fontes também em relação às coenzimas.

Os valores de n na presença de NADH e NADPH não decresceram significativamente, ao contrário do que ocorreu com ATP.

O significado dos valores de n menores que a unidade, encontrados principalmente na presença de ATP, deve ser procurado numa análise dos efeitos de metabólitos sobre outras enzimas já estudadas.

Changeux (54) menciona que o valor de n é uma medida do coeficiente de interação entre sítios de uma mesma molécula de proteína. A comparação das propriedades da L. Threonina deaminase e de um número de outras enzimas reguladoras (55, 56, 57, 58) levaram à definição do conceito de "interação alostérica" emitida por este autor em 1963 (59). Esta interação pode ser no sentido de ao ligar-se um metabólito num dos sítios

da enzima tornar-se mais fácil a entrada de um segundo ligante no sítio seguinte, propiciando então uma cooperatividade positiva. No caso da ligação do efetor dificultar a entrada do segundo ligante na molécula tem-se o contrário, isto é, cooperatividade negativa. Quando a ligação de um metabólito não altera a entrada do substrato ou do cofator na molécula de enzima o comportamento cinético é concordante com a equação de Michaelis Menten, obtendo-se um valor de n igual a 1 (49, 60, 61).

Recentemente Levitzki e Koshland (62) abordaram apropriadamente a existência de cooperatividade negativa em enzimas reguladoras. São raras as indicações de cooperatividade negativa em trabalhos anteriores a 1968, no entanto, segundo estes autores ela deve aparecer em muitas enzimas.

A cooperatividade negativa ou positiva é caracterizada pelo fato do coeficiente angular da reta obtida no gráfico de Hill ser menor ou maior que 1, entretanto poucos trabalhos mencionam a ocorrência de um coeficiente angular menor que 1 (20, 28, 29, 30).

Levitzki e Koshland (62) consideraram apropriadamente os tipos de curvas que se deve esperar quando está ocorrendo cooperatividade positiva, negativa e neutra, isto é, no caso da cinética clássica de Michaelis Menten.

Utilizando os elementos fornecidos pelos trabalhos indicados acima pode-se sugerir que, segundo os resultados obtidos no presente trabalho, o ATP alteraria o comportamento cinético da enzima com relação ao seu substrato causando uma cooperatividade negativa. No entanto, para que se possa concluir com segurança que o ATP comporta-se como efetor alostérico sobre a G-6-PD de P.circinatus, será necessário um estudo mais aprofundado não só da cinética de reação como também das alterações conformacionais da enzima na presença de metabólito.

5

CONCLUSÕES

1. A desidrogenase da glucose-6-fosfato (D-glucose-6-fosfato: NADP oxido-redutase EC 1.1.1,49) presente nos extratos livres de células de P.circinatus foi purificada 69,4 vezes.

A enzima é específica para NADP, apresenta uma atividade máxima em pH 8,0 - 8,4 a 30°C, o Km para G-6-P é de $6,8 \times 10^{-4} \text{M}$ e para o NADP é de $1 \times 10^{-4} \text{M}$.

2. O efeito de ATP sobre a atividade enzimática é mais marcante a pH 6,7, provocando inibição total na concentração 4mM. No pH ótimo não se evidenciou inibição mas os valores de n foram significativamente alterados.
3. A atividade enzimática a pH 8,0 foi marcadamente inibida por R-5-P, ADP e AMP5', todos nas concentrações finais de 2mM.
4. Os piridino nucleotídeos reduzidos, nas concentrações utilizadas não alteram significativamente a cinética de reação para a G-6-P.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - NOLTMANN, E.A. & KUBY, S.A. . In The Enzymes, ed. P.D. Boyer, New York, Academic Press, 1963, vol. 7, p. 223.
- 2 - HORECKER, B.L. Bull. Chim.Biol., 40 (4): 555, 1958.
- 3 - W.M.FITCH & I.L.CHAIKOFF . J.Biol.Chem., 235: 554,1960.
- 4 - CAPRIOLI, R. & RITTENBERG, D. . Proc.Nat.Acad.Sci USA, 60: 1379, 1968.
- 5 - OSMOND, C.B. & PRESS, T. . Biochem, Biophys.Acta, 184: 35, 1969.
- 6 - HOLZER, H. & WITT, I. . Biochem, Biophys.Acta, 38: 163, 1960.
- 7 - KIRKMAN, H.N. & HENDRICKSON, E.M. . J.Biol.Chem., 237: 2371, 1962.
- 8 - SANWAL, B.D. . J.Biol.Chem., 245 (7): 1626, 1970.
- 9 - UMBARGER, H.E. . Ann.Rev.Plant Physiol., 14: 19, 1963.
- 10 - GLASER, H. & BROWN, D.H. . J.Biol.Chem., 216: 67,1955.
- 11 - EGER-NEUFELDT, I., TEINZER, A., WEISS, L., WIELAND, O. . Biochem.Biophys.Res.Comms. 19: 43, 1965.
- 12 - TAKETA, K. & POGELL, B.M. . J.Biol.Chem., 241(3): 720, 1966.
- 13 - PASSONEAU, J.V., SCHULZ, D.W., LOWRY, O.H. Fed.Proc. 25: 219, 1966.

- 14 - AVIGAD, G. . Proc.of Nat.Ac. of Sci. U.S.A., 56: 1543, 1966.
- 15 - BONSIGNORE, A., DE FLORA, A., MANGIAROTTI, M.A., LORENZONI, I. . Ital.J.Biochem. 15 (6): 458, 1966.
- 16 - LEE, L.P.K & KOSIECKI, W.C. . Can.J.of Biochem., 45: 1279, 1967.
- 17 - MATSUDA, T. & YUGARI, Y. . J.of Biochem., 61 (5):541, 1967.
- 18 - YUROWITZKI, Y.G. & MILMAN, L.S. . Biochem.Biophys.Acta, 99: 543, 1965.
- 19 - LESSIE, T. & NEIDHARDT, F.C. . J.of Bacteriol. 93 (4): 1337, 1967.
- 20 - LUZZATTO, L. . Biochem.Biophys.Acta, 146: 18-25, 1967.
- 21 - SOLDIN. S.J. & BALINSKY, D. . Biochem. 7 (3): 1077,1968.
- 22 - CHUNG, A.E. & LANGDON, R.G. . J.of Biol.Chem., 238: 2317, 1963.
- 23 - YOSHIDA, A. . J.of Biol.Chem. 241 (21): 4966, 1966.
- 24 - GREENHOUSE, W.V.V., NOWAKI, H., Coe, E.L. . Biochem. Biophys.Acta, 191: 167, 1969.
- 25 - SHINDLER, J. & SCHLEGEL, H.G. . Arch. Mikrobiol. 66 (1): 69, 1969.
- 26 - HORNE, R.N., ANDERSON, W.B., NORDLIE, R.C. . Biochem, 9: 610, 1970.
- 27 - OLIVE, C., GEROCH, M.E., LEVY, R.H. . J.of.Biol.Chem. 246 (7): 2047, 1971.

- 28 - MUTO, S. & URITANI, I. . Plant and cell Physiol. 11: 767, 1970.
- 29 - CONWAY, A. & KOSHLAND, D.E. . Biochem. 7: 4011, 1968.
- 30 - DALZIEL, K. & ENGEL, P.C. . FEBS LETTERS, 1: 349, 1968.
- 31 - AFOLAYAN, A. & LUZZATTO, L. . Biochem, 10 (3): 415, 1971.
- 32 - JAGANNATHAN, V., RANGACHARI, P.N., DAMORADAN, M . Biochem. J. 64: 477, 1956.
- 33 - RADHAKRISHNAN, A.N. . Biochem.Biophys.Acta 40: 546, 1960.
- 34 - BRODY, S. & TATUM, E.L. . Proc.of Nat.Acad.of Sci.U.S.A. 56: 1290, 1966.
- 35 - SCOTT, W.A. & TATUM, E.L. . Proc. of Nat. Ac. of Sci USA, 66 (2): 515, 1970.
- 36 - SATO, M. & VEIGA, L.A. . Ciência e Cultura 21(3): 648, 1969.
- 37 - ENGEL, H.J., DOMSCHKE, W., ALBERTI, M. & DOMACK, G.F. . Biochem.Biophys.Acta, 191: 509, 1969.
- 38 - DOMSCHKE, W. & DOMACK, G.F. . Biochem.Biophys.Acta, 207: 485, 1970.
- 39 - BROAD, T.E. & SHEPHERD, M:G. . Biochem.Biophys.Acta.198: 407, 1970.
- 40 - MARKUS, Z., MILLER, G., AVIGAD, G. . Applied.Microb. 13: 686, 1965.
- 41 - KORNBERG, A. & HOERECKER, B.L. . J.Biol.Chem., 175: 385, 1948.

- 42 - LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J.
 . J. Biol.Chem. 193: 265, 1951.
- 43 - SCHALES, O. & SCHALES, S. . J.Biol.Chem. 140: 879, 1941.
- 44 - SCHALES ET AL. . J.Biol.Chem,140: 879, 1941.
- 45 - FISKE, C.H. & SUBHAROW, Y. . J.Biol.Chem. 66: 375, 1925.
- 46 - DIXON, M. Biochem J., 55: 170, 1955.
- 47 - HILL, A.J. . Biochem. J. 7: 471, 1913.
- 48 - ATKINSON, D.E., HATHAWAY, J.A. . J.Biol.Chem. 240; 2.682.
- 49 - ATKINSON, D.E. . Ann.Rev.Biochem. 35: 85, 1966.
- 50 - FRIEDEN, CARL . J.of Biol.Chem. 242: 4045, 1967.
- 51 - DE MOSS, R.D., GUNSALUS, I.C. & BARD, R.C. . J.of Bacte-
riol, 66: 10, 1953.
- 52 - KORNBERG, A. J.Biol.Chem 182: 805, 1950.
- 53 - HOLMES, P.K. & LEVINSON, H.S. . Biochem.Biophys.Res.
Commun 38 (1): 143, 1970.
- 54 - CHANGEUX, J.P. . Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.,
26: 313, 1961.
- 55 - GERHART, J.C. & PARDEE, A.B. . J.Biol.Chem. 237: 891,
1962.
- 56 - MARTIN, R.G. . J.Biol.Chem. 237: 257, 1962.
- 57 - STADMAN, E.R., COHEN, G.N. . J.Biol.Chem. 236: 2033,
1961.

- 58 - PATTE, J.C., G. LeBras, T.LOVINY, COHEN. G.N. . Biochem. Biophys.Acta. 67: 16, 1963.
- 59 - MONOD, J., CHANGEUX, J.P., JACOB, F. . J.Mol.Biol. 6: 306, 1963.
- 60 - WYMAN. J. . Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28: 483, 1963.
- 61 - RUBIN, M.M. & CHANGEUX, J.P. . J.Mol.Biol., 21: 265, 1966.
- 62 - LEVITZKI, A. & KOSHLAND, D.E. . Proc.Natl.Acad.Sci. 62: 1121, 1969.
- 63 - COHEN, S.S. & SCOTT, D.B.M. . Biochem.J., 55: 23, 1953.
- 64 - STADMAN, E.R. . Advances in Enzy mol. 28: 41, 1966.
- 65 - BALINSKY D & BERNSTEIN R.E. . Biochem.Biophys.Acta 67: 313, 1963.

AGRADECIMENTOS

Agradeço de modo especial à DRA. GLACI T. ZANCAN pela orientação e apoio científico ao presente trabalho.

Agradeço também aos componentes do Instituto de Bioquímica e aos colegas pela colaboração e incentivo; à Coordenação de Pessoal de Nível Superior(CAPES), ao Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico (FUNTEC) pelo suporte financeiro.